



がんの遺伝子診断

松浦成昭*1, 山口昌江*1, 大西智子*1, 新谷康*1, 森誠司*1, 山本浩文*2

*1 大阪大学医学部保健学科病態生体情報学講座分子病理学研究室：吹田市山田丘1番7号（〒565-0871）

*2 大阪大学医学部病態制御外科学講座

Key Words

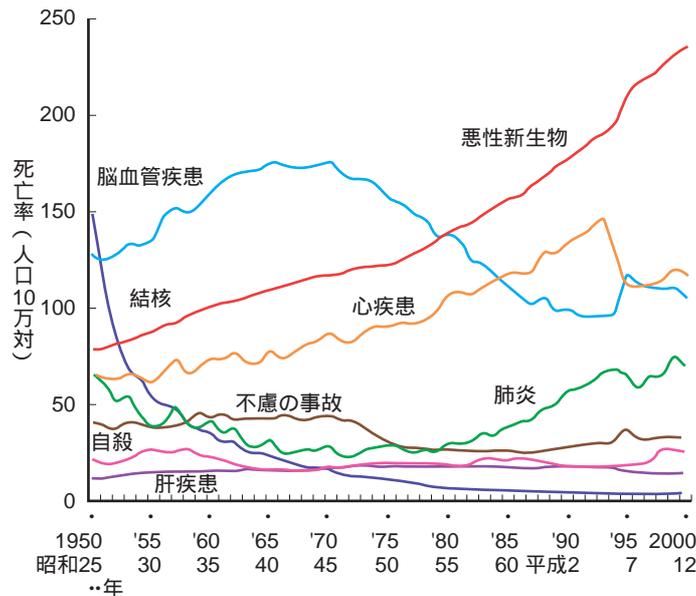
がん, 遺伝子診断, 遺伝性腫瘍, 微小転移, 悪性度

日本におけるがんの実態

我が国の疾病構造は第二次世界大戦後激変し、かつて死因のトップとして恐れられていた結核に代表される感染症から、生活習慣病へと大きな変貌を遂げた。現在ではがん、心疾患、脳血管疾患のいわゆる三大生活習慣病で実に6割の日本人が亡くなっている。感染症とは異なり、生活習慣病は不良な生活習慣の結果起こるので、生活習慣を改善することによる予防の重要

性が叫ばれている。この中でもがんによる死亡者は増加の一途をたどり、年次推移から見ると近年ますます上昇傾向を示しており、減少する気配が全く見られない。最新の厚生労働省の人口動態統計によると日本人の死亡総数の30.7%を占めており、続く心疾患・脳血管疾患で死亡する数の合計を上回っている（図1）¹⁾。

がんの発生・進展の基礎的なメカニズムはもとより、診断・治療についても大きな進歩が見られる一方



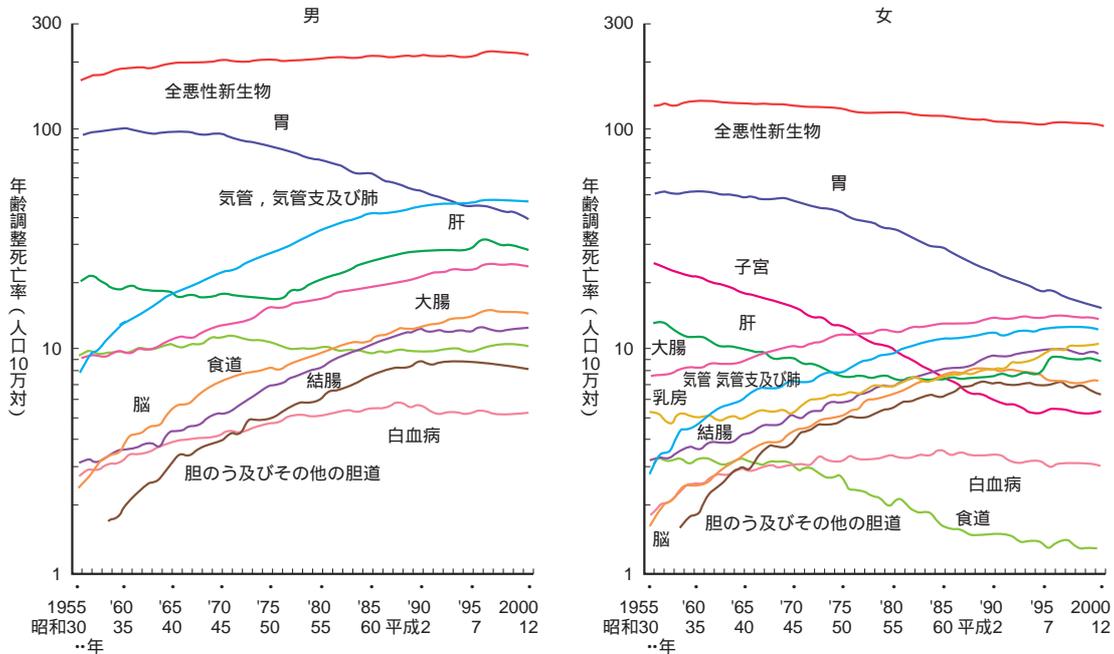
資料 厚生労働省「人口動態統計」

図1. 主要死因別にみた死亡率(人口10万対)の年次推移

で、がんで亡くなる人が減少する傾向が見られないのは人口の高齢化も一因であるが、中期あるいは末期のがんに対する治療がまだ不十分であることを示している。すなわち、早期診断され早期治療が可能な早期癌の治療成績は確実に向上しているが、中期以後のがんの予後はほとんど改善されていないのが現状である。がんの死亡率を部位別に見ると(図2)、胃癌及び子宮癌が減少傾向にあることに気づくが、これらはレントゲンや細胞診による検診システムの普及による貢献が大きいことが理解されよう。逆に増加傾向の著しい肺癌、大腸癌、膵癌、乳癌等は早期発見に向けた検診体制が遅れていることが1つの要因としてあげられる。増加傾向の著明ながんはいずれも欧米で多数を占めているがんであり、日本人の罹患するがんのパターンは確実に欧米のパターンに近づいている。日本におけるライフスタイルの欧米化が大きな要因を与えていることが容易に理解できる。

がんの診療の現状

現在のがんの診断は画像診断と病理診断によっていって過言ではない。基本的に局所疾患であるがんを見つけるためには、必然的に局所病変を認識する何らかの形態学的手法が必要になる。身体内部の情報を得ることは画像診断の進歩で飛躍的に増加した。特に近年のMRI (Magnetic Resonance Imaging), PET (Positron Emission Tomography) 等の新しい検査法の導入、画質の向上、コンピューターの使用による精細な情報の取得等で非常に小さな病変の存在診断はもとより、質的診断もかなりのレベルまで行えるようになった。しかし、画像診断は「像」を検出しているだけで、完全な確定診断とはなり得ない。最終的な確定診断はがん細胞を検出することが必須であり、病理診断が必要とされる。現在の病理診断は大部分が組織あるいは細胞を顕微鏡的に形態学的に診断している。この手法自体にテクノロジー面での進歩はほとんどなく、ある意味ではほぼ



注 1) 年齢調整死亡率の基準人口は「昭和60年モデル人口」である。
 2) 大腸は、結腸と直腸S状結腸移行部及び直腸を示す。ただし、昭和40年までは直腸肛門部を含む。
 3) 結腸は大腸の再掲である。
 4) 肝は肝及び肝内胆管である。
 資料 厚生労働省「人口動態統計」

図2. 部位別にみた悪性新生物の年齢調整死亡率(人口10万対)の年次推移

完成された方法である。近年、細胞におけるタンパク質の発現を検出する免疫組織学的手法が確立し、必要に応じて併用することにより、これまではほぼ満足する結果を得てきた。

しかし、画像診断、病理診断ともいずれも形態学的診断方法であり、がんの性格を形態像から得ることは容易ではない。また、現状では作成された画像も顕微鏡像も二次元的な像として捉えられているが、実際のがん病変は立体的な病変であり、discrepancyが生じることになる。すなわち画像診断でシャープな画像は面として得られるが、すべての面の画像を見ることは不可能なので、ある面と次の面の間に検索できない部分が存在する。病理診断では切片を顕微鏡で観察する必要性もあり、通常数ミクロンのスライスを観察して診断している。肉眼的な所見も併用して最も必要な部分を顕微鏡で観察しているため、多くの場合、これで診療上問題は指摘されていないが、厳密には多くの問題を内包している。理論上、これらの欠点を打破するには腫瘍組織を全体として検索する方法が必須となる。

遺伝子診断の必要性

これまでのがんの診断はX線、超音波、MRI等の画像診断による存在診断の後に、組織・細胞を採取して病理診断により確定診断を行ってきた。これらの手法はそれなりに機能していると考えられるが、ともに形態学的な診断法であるための欠点が存在する。特に形態学的手法は定量性に乏しく、評価も主観的にならざるを得ない点が指摘されてきた。また、今後のがんの診療には複数の治療法からの選択、治療成績の予測等、現在よりもさらに幅広い多彩な情報が求められるようになってきた。近年の分子生物学の進歩により、がんは遺伝子の異常に起因する疾患であることが明らかにされ、多くの研究が行われてきた。これらの研究成果に基づいた新しい遺伝子診断に大きな期待が寄せられている。

現在期待されているがんの遺伝子診断として、1) 将来がんになるか、あるいはなりやすい体質であるかを診断する疾患感受性診断(発症前保因者診断及び易罹患性診断)、2) ある臓器、組織にがん細

胞が存在するか等の存在診断、3) 転移しやすい、あるいは再発しやすい等の悪性度をみる性質診断、の3つが考えられる。

がんの疾患感受性の遺伝子診断

あらゆる疾患の原因は本人の内因(遺伝性素因)と外因(環境要因)と言われるが、がんも例外ではなく、「がんにかかりやすい素因」を持った人はいると考えられる。この中には明らかにメンデルの法則に従い常染色体優性遺伝をするものから、発がん物質に対する感受性に関連する遺伝子の多型性のため、がん罹患する可能性が高いと考えられる人まで種々のものが存在する。いずれも本人の遺伝子の検索により、容易にその異常が検出されるので、将来がんになるか、あるいはなりやすい体質であるかを診断する発症前保因者診断及び易罹患性診断として有用である。

1. 遺伝性腫瘍

がんの患者の中には家族集積性を示すものが少なくないが、大部分は生活習慣を含めた環境要因によると言われている。食事の嗜好や肝炎ウイルスの家族内感染等がその一例である。その中で遺伝性(家族性)腫瘍として知られているものが全体の5~10%くらいある。遺伝性腫瘍はある特定の臓器に特殊ながんができたり、また大腸に多くのポリープが多発する等その遺伝性素因が表現型として明らかになりやすいものと、大腸癌・乳癌等一般的にも比較的頻度の高いがんが家系内に多数集積しているものとに大別される(表1)。前者の代表が、網膜芽細胞腫、家族性大腸腺腫症等で、常染色体優性遺伝形式で遺伝し、原因遺伝子の探索から癌抑制遺伝子が単離された。それに対して、後者にはLi-Fraumeni症候群、Lynch症候群等、従来いわゆるがん家系症候群と称されてきたものや、家族性の乳癌あるいは卵巣癌等が含まれる。

1) 網膜芽細胞腫(retinoblastoma)

一番最初に原因遺伝子がクローニングされたのが網膜芽細胞腫である。網膜芽細胞腫は網膜芽細胞に由来する小児悪性腫瘍であり、出生数15,000~

表 1 . 遺伝性腫瘍と原因遺伝子

原因遺伝子	染色体局在	遺伝性腫瘍	非遺伝性腫瘍
1 . 癌抑制遺伝子			
R6	13q14	網膜芽細胞腫	骨肉腫, 肺癌等多数
p53	17p13	Li-Fraumeni症候群	ほとんどすべての腫瘍
WT1	11p13	Wilms腫瘍	腎芽腫
NF1	17q11	多発性神経線維腫症 1	神経芽腫, 悪性黒色腫等
APC	5q21	家族性大腸腺腫症	大腸癌, 胃癌, 膀胱癌
NF2	22q12	多発性神経線維腫症 2	髄膜腫, 神経芽腫
VHL	3p25	von Hippel-Lindau病	腎癌, 血管芽細胞腫等
TSC2	16p13	神経膠腫, 腎血管筋脂肪腫	
p16	9p21	家族性悪性黒色腫	悪性黒色腫, 腎癌
BRCA1	17q21	家族性乳癌, 卵巣癌	卵巣癌
BRCA2	13q12-13	家族性乳癌, 膀胱癌	肝細胞癌
PTC	9q22	基底細胞癌	基底細胞癌
PTEN	10q23	Cowden病 (乳癌, 甲状腺癌)	神経膠腫, 前立腺癌等
MEN1	11q13	多発性内分泌腺腫症 1 型	
2 . DNAミスマッチ修復酵素遺伝子			
hMSH2	2p21-p22	遺伝性非ポリポ - シス大腸癌	大腸癌, 子宮体癌
hMLH1	3p21	遺伝性非ポリポ - シス大腸癌	大腸癌, 子宮体癌
hPMS1	2q31-q33	遺伝性非ポリポ - シス大腸癌	大腸癌, 子宮体癌
hPMS2	7p22	遺伝性非ポリポ - シス大腸癌	大腸癌, 子宮体癌
3 . 癌遺伝子			
ret	10q11	多発性内分泌腺腫症 2 型	甲状腺髄様癌
met	7q31	遺伝性乳頭状腎細胞癌	遺伝性乳頭状腎細胞癌

34,000 に対して 1 人程度の発症頻度を示す。約 40% が遺伝性を示し, 特に両側性の発症例ではほぼ 100% 遺伝性と考えられている。原因遺伝子としてクローニングされた RB 遺伝子はヒト第 13 染色体 q14 に位置し, 928 アミノ酸からなるタンパク質 pRB をコードする。pRB は特異的な塩基配列結合能は持っていないが, E2F を初めとした転写因子と結合してその活性を制御することにより細胞周期の進行を調節していると考えられている²⁾。網膜芽細胞腫における RB 遺伝子変異の 80% は点突然変異であり, ストップコドンを生じるナンセンス変異が多い。また, 網膜芽細胞腫のみならず骨肉腫, 肺小細胞癌, 乳癌, 膀胱癌等でも頻度は低い RB 遺伝子の欠失や変異が見られる。

2) 家族性大腸腺腫症

(Familial Adenomatous Polyposis, FAP)

家族性大腸腺腫症は常染色体性優性に遺伝する疾患で, 10,000 ~ 20,000 人に 1 人くらいの発症頻度と言われる。10 代から大腸に多数のポリープができ, 治療しないと 100% 癌化する (図 3)。原因遺伝子としてヒト第 5 染色体 q21-22 に APC 遺伝子がクローニングされた。APC 遺伝子産物は 2,843 個のアミノ酸が



図 3 . 家族性大腸腺腫症

大腸粘膜に無茎性の多数のポリープが密生している。大きなポリープの一部はがん化していた。

らなり, カテニンと結合して, その分解を促進する働きを行っている³⁾。家族性大腸腺腫症の場合, APC 遺伝子に 1 ~ 10 数塩基の小さな欠失または挿入が見られ, 結果としてフレームシフト変異を生じる。APC に変異があると, その遺伝子産物は カテニンと結合できなくなり, カテニンが安定化して転写の活性化が亢進して腫瘍を起こすと考えられている。また, APC 遺伝子の変異は散発性大腸癌でも高頻度

に見出され、大腸癌の多段階発がんのステップの1つとして重要である。

3) 遺伝性非ポリポシス大腸癌

(Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer, HNPCC, Lynch 症候群)

FAPと異なり形態学的には通常の大腸癌と変わらないが、家族性の集積を認める大腸癌があり、遺伝性非ポリポシス大腸癌としてまとめられた。発症頻度は200～2,000人に1人で、全大腸癌の1～6%を占めると言われている。常染色体性優性遺伝を行い、若年発症が多く、また右側大腸に多く、低分化型腺癌が多いが、予後は比較的良好である。原因遺伝子が複数報告されているが、いずれもミスマッチ修復遺伝子で、hMLH1とhMSH2が多くを占めている。これらの遺伝子に異常があると、遺伝子の複製エラーが蓄積し、最終的に発がんに至ると考えられている⁴⁾。

4) 家族性乳癌

第1近親者に本人も含めて2人以上の乳癌患者がいる場合、家族性乳癌と呼ばれ、全乳癌の5～10%と推定されている。優性遺伝形式を取る家族性乳癌の患者から原因遺伝子としてBRCA1、さらにBRCA2がクローニングされた。この2つの遺伝子の異常が米国では家族性乳癌の原因の80%に見られると報告されているが、我が国では20～30；60～80%程度と言われている。BRCA1遺伝子変異は乳癌のほか卵巣癌を起す危険性が高く、BRCA2は乳癌のほか

に卵巣癌、前立腺癌、膵癌等多くのがんとの関連性が指摘されている。これらの遺伝子のコードするタンパク質の機能はまだ完全に解明されていないが、いずれもDNA修復に重要な役割を果たしていると考えられている⁵⁾。

5) 遺伝性腫瘍に対する遺伝子診断

がんの遺伝子診断の検査を考える時、体細胞レベルか生殖細胞レベルかを区別して考える必要がある。体細胞レベルの遺伝子変異の検査はがん細胞のみでの変異を見る検査であり、検査の意味としては従来の病理検査と同等と考えられる。これに対して、生殖細胞レベルでの変異は遺伝性腫瘍の診断を意味するが、従来のがんの検査には全く存在しなかった分野であり、種々の遺伝子診療に関するガイドラインを参考に実施しなければならない。

遺伝性腫瘍の可能性のある患者に対しては生殖細胞レベルで遺伝子診断が可能であり、組織サンプルを取る必要がなく、血液中の白血球のDNAを調べるだけで容易に検査が可能である。

American Society of Clinical Oncology (ASCO)では責任遺伝子が明らかになっている遺伝性腫瘍の遺伝子診断を3つのカテゴリーに分類して取り扱うことを提唱している(表2)⁶⁾。グループ1は遺伝子検査の有用性が確立された疾患であり、遺伝子変異と発症の有無が1:1で対応しているので、リスクのある未発症者における遺伝子診断の結果が早期発見・早期治療に結びつけることができる。グループ2,3で

表2. がんの易罹患性診断 (ASCO分類)

	診断に用いる遺伝子	疾患名	原因遺伝子と易罹患性との関係	ヘテロ保有者同定の医療メリット
グループ1	APC	家族性大腸腺腫症	明確に同定されている	治療方針決定に有利標準的な医療の一部とみなされている
	RET	多発性内分泌腺腫症II型		
	RB1 VHL	網膜芽細胞腫 von Hippel-Indau病		
グループ2	hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2, hMSH6	遺伝性非ポリポシス 大腸癌	かなり明らかだが なお研究段階 である	未確認, 研究段階
	BRCA1, BRCA2	家族性乳癌		
	p53	Li-Fraumeni症候群		
グループ3	p16	悪性黒色腫	わずかの家族で しかわかってい ない	未確認
	CDK4	悪性黒色腫		
	ATM	乳癌		

CDK4 : Cyclin-Dependent Kinase4, ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated

は遺伝子変異の浸透率が低いことが不明であり、遺伝子変異を引き継いだ人が発症するか否か確実なことが言えない。すなわち、グループ1に比べて遺伝子診断の実用性が低いことを理解しておく必要がある。実際、米国では進んでいるBRCA遺伝子の発症前診断は、もし陽性の結果が得られたとしても、乳癌になる確率が高いことは考えられるが、どのような意義を持っているか明らかにされていない。これに対して家族性大腸腺腫症では陽性の結果が得られたら、保因者も100%発症することが明らかになっており、予防的な大腸の摘出手術も考案・実施されている。

2. 発がん物質に対する感受性

私たちを取り巻く環境には種々の発がん物質が存在し、喫煙、飲酒がその代表である。しかし、ヘビースモーカーにも関わらず肺癌にならない人も存在する。これは発がん物質に対する感受性に個人差があることを示しており、その意味で発がん物質に対する感受性を決める遺伝子の多型が目玉されている。p450ファミリーには生体内の様々な異物を解毒するために多数の酵素が存在する。薬剤に対する反応が個人で異なるのはp450の遺伝子多型が原因の1つであることがわかっている。同様に、発がん物質の感受性にも個人差が認められ、タバコ中のベンツピレンはp450CYP1A1によって発がん作用のあるベンツピレン中間型に代謝される。現在この酵素には高活性型と低活性型の2種が同定されており、タバコと肺がんの因果関係についての研究が進んでいる⁷⁾。

アルコールの代謝にもcatalase, ADH (Alcohol Dehydrogenase), ALDH (Aldehyde Dehydrogenase), p450CYP2E1等の酵素が必要である。この中でALDH2がアセトアルデヒドの分解に重要な酵素であり、多型が存在する。ALDH2*1/2*2のヒトはいわゆる「酒に弱い」ヒトであるが、この多型を持ったヒトは軽度のアルコール摂取者でも食道癌等を起こすリスクがコントロール (ALDH2*1/2*1) に比べて6倍高いことが明らかにされた⁸⁾。

疾患感受性を規定する遺伝子群の解析は単一の遺伝子だけでなく複数の遺伝子が複雑に関係しており、また個々の患者のバックグラウンドが異なること

から膨大なデータの解析が必要となる。しかし、がんにかかりやすい遺伝子多型の情報を蓄積することは今後ますます重要になると考えられる。

がんの存在の遺伝子診断

早期発見され早期治療されたがんの治療成績が良いのに、中期以後のステージのがんの治療成績が悪いのはどうしてだろう？がんの治療法はほとんどが手術によるものであり、一部のがんは放射線治療が行われているが、いずれの治療法も局所療法である。根治的な治療ができたと考えてもある割合で治療の後、時間を置いてがんが再発し、最終的に死亡する。再発の部位は多くの場合、遠隔臓器であり、局所治療である手術（あるいは放射線照射）では転移という全身病になっている状態のがんに対処できないことを示している。がんの再発とは癌細胞の遺残に起因し、ある時間をかけて増大した腫瘍を再発と呼んでいるだけの話である。手術時に遠隔転移がないというのは、大部分は画像診断で検出されないということであり、肉眼的診断の限界を示しているとも考えられる。本質的にがんはがん細胞というミクロなレベルの疾患であり、マクロな画像診断では微小な病変を検出することはできない。微小な病変はいかなる方法をもってしても容易に検出することは難しかったが、遺伝子を大量に増幅できるPCR (Polymerase Chain Reaction) 法が開発されて、可能となった。

1. リンパ節における微量がん細胞の検出

1) がんの治療におけるリンパ節郭清の意義

がんを手術により根治的に治療することを目指すためには原発巣だけではなく、がん細胞が存在する可能性がある周囲の組織やリンパ節をすべて摘出する必要がある。がんは肉眼的に認識される疾患ではあるが、実際はがん細胞というミクロのレベルで見ることができない病変を相手に治療に望まなければならない。そのため、がんの根治術においては周囲組織を含めて十分な距離を取って原発巣を切除するとともに、所属リンパ節を腫瘍の占める領域を支配する血管の根部を含めて一括切除する系統的リ

ンパ節郭清が行われており、大部分のがんにおいてほぼ確立した基本手技となっている（図4）。

このようながんにおけるリンパ節郭清の意義は転移のあるリンパ節を切除することによって根治を目指すという治療的意義に加えて、リンパ節の転移状況を調べて病期判定を行い、予後の予測を行うと同時に補助療法の適応決定の指標とする意義も重要である。リンパ節郭清の治療的意義はこれまで疑うことなく認められてきた。少なくとも明らかに転移のあるリンパ節を残して根治は望めないと考えられる。しかし、どこまで切除範囲を広げれば良いのか、どの範囲を切除すべきかについての結論は出ていない。さらに画一的なリンパ節郭清に問題があることも指摘されている。例えば、早期癌の症例に広範囲に郭清を行っても結果的には転移を認めず郭清が不要であったと考えられる症例が少なからず存在する。また、直腸癌における側方リンパ節郭清のように術後の患者のQOLを大きく損なう危険があるものも見られる。一方、がんの予後の予測の上ではリンパ節転移の有無は多くのがんで強力な予後因子となることは多数の報告で明らかにされてきた。しかし、従来の診断基準で同じ進行度と診断された症例でも早期再発する場合と再発しない症例があることも周知の事実である。最近このような従来から行われてきたリンパ節郭清に対して、あるいはその根拠となってきた病理組織学的な解析に対して、さらにはリンパ節転移に対する基本概念について見直しを迫る知見が報告されつつある。例えば、分子生物学的な手法や免疫組織学的方法による微小癌細胞検出技術はこれまで行われてきたHE染色による病理組織学的診断では見逃されてきた微小リンパ節転移の存在を証明し、癌の進行度判定の根拠そのものを揺さぶりつつある（図5）。また、悪性黒色腫や乳癌等でその有用性が示されてきたセンチネルリンパ節の概念⁹⁾は画一的に行われてきたリンパ節郭清に対して、個々の症例に応じたリンパ節転移郭清の適応という考え方を示した。そして、このような治療法の個別化の試みはがん治療における患者のQOLを重視する考え、あるいは医療経済的な立場から注目されるに至った。

2) リンパ節における微小転移の検出

これまで多くの施設からリンパ節をすりつぶして

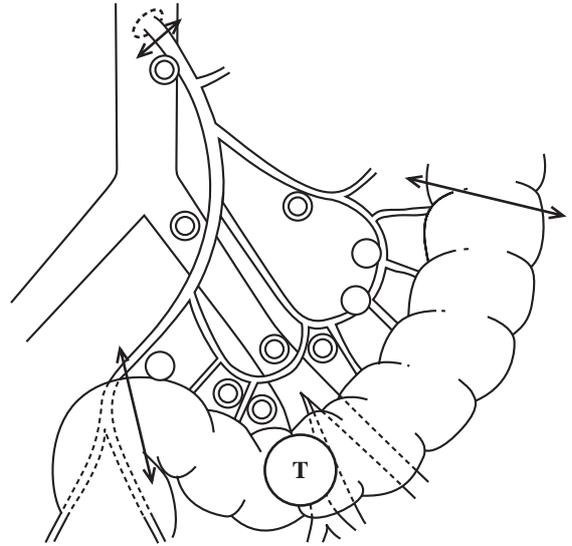


図4．がんの手術（系統的リンパ節郭清）

がんの手術はS状結腸にある原発巣（T）のみならず、がん細胞が存在している可能性のあるリンパ節をすべて摘出しなければならない。リンパ節は血管に沿って存在するので、血管と一緒に切除する。通常、下腸管膜動脈を根部（矢印）で切離し、下腸管膜動脈沿いのリンパ節を領域の血管とともに一塊として切除する。

ホモジナイズし、抽出したDNAあるいはRNAを用いて、癌細胞に特異的な遺伝子（あるいは上皮細胞に特異的な遺伝子）をPCR法を用いて増幅する方法の有用性が報告されている。しかし、このようにして検出された微量ながん細胞の存在の臨床的な意義については必ずしも一致した見解が得られてきた訳ではない（表3）¹⁰⁾。大腸癌を例に取ると、免疫組織学的染色法あるいはDNAもしくはRNAを標的にした遺伝子診断法で所属リンパ節の検出に成功した報告がいくつか見られるが、予後との相関に関しては一致した見解が得られていない。全体的にはCEA（Carcinoembryonic Antigen）やサイトケラチンの特異抗体を用いた免疫染色では、通常の病理学的検索でリンパ節転移を認めない症例の26～39%に微小転移を認めるが、大腸癌患者の予後には関連しないという報告が優勢である¹¹⁾。一方、遺伝子診断による検索では、HayashiらはMASA（Mutant Allele Specific Amplification）法によりK-rasあるいはp53変異を指標に微小リンパ節転移を診断したが、微小転移陽性の37例中27例が術後5年以内に再発したのに対して、微小転移陰性34例では全く再発が見られず、微小転移と再発との間に高い相関が認められた¹²⁾。また、

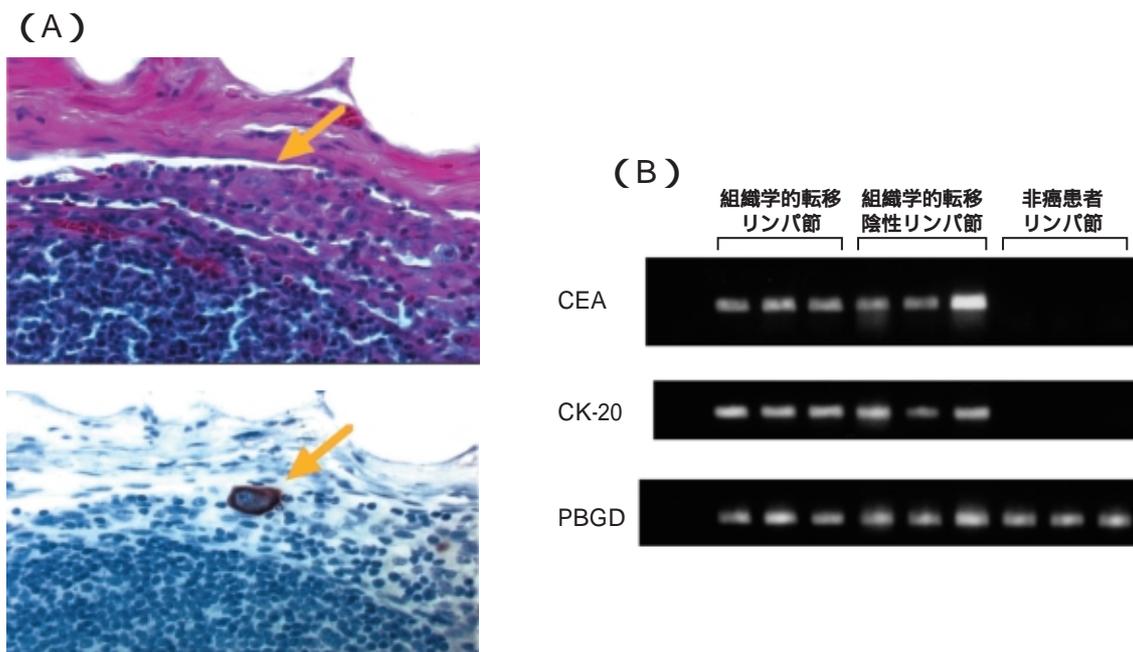


図5. リンパ節における微小転移の検出

(A) : HE 染色ではがん細胞の存在は判定が容易ではないが、サイトケラチンによる免疫染色を行うと被膜下にごん細胞が検出される。
 (B) : CEA, サイトケラチン20 (CK-20) を指標に RT-PCR を行ったところ、組織学的に陽性と診断されたリンパ節のみならず、陰性と診断されたリンパ節にも mRNA の存在を認め、微小転移があると考えられた。非癌患者からのリンパ節はすべて陰性であった。

表3. リンパ節における微小がん細胞の検出と臨床的意義

原発腫瘍	マーカー	方法	検出率	臨床的意義	報告者
乳癌		HE	83/927 (9%)	DFS, OS	Bettelgeim
		HE	118/1,680 (7%)	DFS, OS	de Mascarel
	mucin,CK	IHC	52/208 (25%)	DFS	McGuckin
	CK	IHC	147/736 (20%)		Cote
	CA15-3,MCA	IHC	5/39 (13%)	DFS	Bryrne
	CK	IHC	48/484 (11%)	DFS	Gerber
	CK	IHC	14/150 (9%)		Braun
	mucin-1	RT-PCR	4/15 (30%)		Noguchi
	CK19	RT-PCR	23/75 (31%)		Schoenfeld
	大腸癌	TAG72,CK	IHC	28/55 (28%)	OS
CK		IHC	39/100 (39%)		Adell
CK		IHC	47/147 (32%)		Oberg
CEA		RT-PCR	14/26 (54%)	OS	Liefers
CK-20,CEA		RT-PCR	31/51 (61%)		Rosenberg
CK-20,CEA		RT-PCR	13/13 (100%)		Futamura
K-ras,p53		MASA	37/71 (52%)	DFS	Hayashi
胃癌	BerEp4	IHC	22/100 (22%)	OS	Siewert
	CK	IHC	8/34 (24%)	OS	Maehara
	CK	IHC	11/75 (15%)	OS	Muller
膵癌	BerEp4	IHC	13/18 (72%)	OS	Hosch
	K-ras	RT-PCR	17/25 (68%)		Demeure
食道癌	BerEp4	IHC	42/68 (62%)	DFS	Izbicki
	CK	IHC	13/41 (32%)		Natsugoe
	CEA	RT-PCR	12/30 (41%)		Luketich
非小細胞性肺癌	BerEp4	IHC	27/125 (22%)	DFS, OS	Passlick
	CK	IHC	31/44 (71%)	DFS	Maruyama
	p53	IHC	14/31 (45%)	OS	Dobashi
前立腺癌	PSA	IHC	7/38 (18%)	FFA	Okegawa

CK : cytokeratin, IHC : immunohistochemistry, DFS : Disease-Free Survival, OS : overall survival

Liefersらは組織学的リンパ節転移陰性の大腸癌患者26例の192個のリンパ節について、RT-PCRによるCEA mRNAの検索を行い、陽性症例は予後不良であると報告した¹³⁾。私たちも組織学的リンパ節転移陰性、stage IIの大腸癌症例の中でRNA保存状況の良い症例62例をretrospectiveに微小転移の意義について検討した。遺伝子診断としてCEAをマーカーとしてRT-PCRを、免疫染色としてサイトケラチンに対する抗体を用いて予後と比較した。その結果、RT-PCRによる微小転移陽性19例の5年生存率は78%で陰性例43例の95%に比して有意に不良であった。一方、免疫染色陽性例と陰性例の間で5年生存率に差を認めなかった(図6)¹⁴⁾。遺伝子検査としての感度を直接比較するために同一症例のリンパ節転移を半割し、一方はサイトケラチンの抗体を用いた免疫染色を、他方はRNAを抽出して、CEAとサイトケラチン20の2種類のマーカーを用いてRT-PCRによる遺伝子診断を行い、両者の結果をprospectiveに検討した。その結果、組織学的転移陰性リンパ節217個のうち、免疫染色では13個(6%)に、RT-PCR法では57個(26%)に陽性所見を認め、RT-PCR法の方が微小転移リンパ節の検出に優れていることがわかった(図5)¹⁵⁾。以

上から、リンパ節をmassとして検索できる遺伝子診断の方が、数切片の検索にとどまる免疫染色による診断よりも高率に微小転移を検出でき、臨床経過を的確に予測できることが明らかとなった。

2. 末梢血，骨髄，腹腔洗浄液における微量がん細胞の検出

上記リンパ節における遺伝子診断は対象が何であっても応用可能である。リンパ節以外でがん細胞の存在診断をつけることが必要な部位として、血液、骨髄、腹水あるいは腹腔洗浄液(胸腔洗浄液)があげられ、いくつかの報告がある(表4~6)¹⁶⁾。

血液中のがん細胞の存在診断は血行性の遠隔転移に直接に関係するので、非常に重要である。最も多く検討されているのは悪性黒色腫であり、tyrosinase mRNAが検出される例では再発が多く予後不良とされている¹⁷⁾。その他、乳癌、前立腺癌、消化器癌等でサイトケラチン、PSA(Prostate Specific Antigen)等のmRNAを検出することにより、がん細胞の存在を証明し、予後と関連するものも見られる。骨髄は骨転移を起こす前のステップであるが、一時的に存在し、血行性転移に進展するという考え方も見られ、

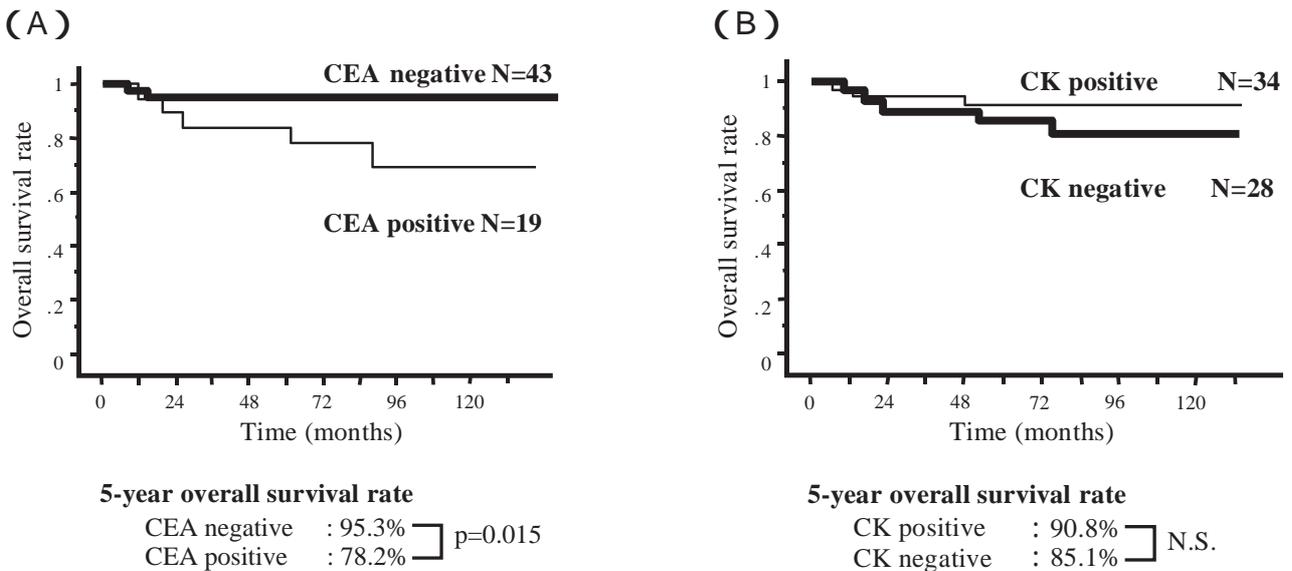


図6. stage II大腸癌においてリンパ節微小転移の予後に及ぼす影響
 (A): リンパ節におけるCEA mRNAをRT-PCR法で検出することによる遺伝子診断で陽性の群は陰性の群に比べて有意に5年生存率の低下が見られた。
 (B): サイトケラチン(CK)による免疫組織学的方法で陽性の群と陰性の群との間には生存率に差が認められなかった。

表4. 末梢血中における微小がん細胞の検出と臨床的意義

原発腫瘍	マーカー	方法	検出率	臨床的意義	報告者
メラノーマ	tyrosinase	RT-PCR	82/186 (49%)	DFS	Curry
	MART-1	RT-PCR	41/186 (23%)	DFS	Curry
	tyrosinase	RT-PCR	38/212 (18%)	DFS	Proebstle
乳癌	CK-19	RT-PCR	17/21 (81%)		Mapara
	CK-19, EGF-R	RT-PCR	20/37 (54%)		Slade
	hMAM	RT-PCR	29/114 (25%)		Zach
大腸癌	CK-19,CK-20,MUC-1,MUC-2	RT-PCR	19/94 (20%)	DFS,OS	Hardingham
	CK-20	RT-PCR	42/65 (65%)		Weitz
	CK-20, CEA	RT-PCR	16/52 (31%)	OS	Yamaguchi
胃癌	CK-20	RT-PCR	3/30 (17%)	DFS	Soeth
肝癌	AFP	RT-PCR	19/20 (95%)		Jiang
	前立腺癌	PSA	RT-PCR	85/319 (27%)	FFS
子宮癌	PSA	RT-PCR	25/84 (30%)		Gao
	PSMA	RT-PCR	8/40 (20%)	FFS	Okegawa
	SCC	RT-PCR	6/15 (40%)		Stenman
小細胞性肺癌	NMB-R	RT-PCR	14/44 (32%)	OS	Bessho

表5. 骨髄における微小がん細胞の検出と臨床的意義

原発腫瘍	マーカー	方法	検出率	臨床的意義	報告者
乳癌	EMA,TAG12, CK	IHC	38/100 (38%)	DFS, OS	Harbeck
	TAG12	IHC	315/727 (43%)	DFS, OS	Diel
	EMA	IHC	89/350 (25%)	DFS, OS	Mansi
	CK	IHC	199/552 (36%)	DFS, OS	Braun
	ErbB-2	IHC	31/52 (60%)	OS	Braun
	mucin	IHC	25/159 (16%)		Porro
	mucin	IHC	21/121 (17%)		Salvadori
	CK-19	RT-PCR	9/34 (26%)	DFS	Datta
	CK-19	RT-PCR	59/83 (71%)	DFS	Fields
	CK-19	RT-PCR	14/23 (61%)		Slade
大腸癌	CK-18	IHC	28/88 (32%)	DFS	Lindeman
	CK	IHC	36/145 (25%)	OS	Leinung
	CK-20	RT-PCR	20/65 (31%)	DFS	Soeth
	CK-20	RT-PCR	71/226 (31%)	DFS	Vogel
胃癌	CK-18	IHC	34/97 (35%)	DFS	Schlimok
	CK-18	IHC	47/78 (60%)	DFS	Heiss
	CK-18	IHC	95/180 (53%)	DFS	Jauch
	CK-20	RT-PCR	11/49 (31%)	DFS	Soeth
食道癌	CK	IHC	37/90 (41%)	DFS, OS	Thorban
膀胱癌	CK	IHC	15/31 (48%)	OS	Roder
非小細胞性肺癌	CK	IHC	17/43 (40%)	DFS	Cote
	CK-18	IHC	83/139 (60%)	DFS, OS	Passlick
	CK-18	IHC	15/39 (39%)	DFS	Ohgami
小細胞性肺癌	NCAM	IHC	19/30 (63%)	OS	Pelosi
前立腺癌	PSA	RT-PCR	39/86 (45%)	FFS	Wood

表6. 腹腔洗浄液中における微小がん細胞の検出と臨床的意義

原発腫瘍	マーカー	方法	検出率	臨床的意義	報告者
大腸癌	カクテル*	IHC	34/109 (31%)	OS	Schott
胃癌	カクテル	IHC	33/62 (53%)	OS	Schott
膀胱癌	カクテル	IHC	31/80 (39%)	OS	Vogel

*CEA, CA19-9, 17-1-A, C54-0, Ra96, KL-1

乳癌のほか、消化器癌でその存在と予後との相関を検討したものが報告されている。mRNAをRT-PCRで遺伝子診断するものよりも免疫組織学的に上皮特異的な抗原を証明した報告の方が多く見られる。消化器癌の転移経路の重要なものに腹膜播種があり、腹腔洗浄液を検討した少数の報告がある。いずれも上皮特異的な複数の抗原を免疫組織学的に証明するものであるが、今後mRNAを指標にした遺伝子診断も検討されていくと考えられる。

がんの性質の遺伝子診断

従来、がんの悪性度の評価は原発腫瘍の大きさ(深達度)、リンパ節転移の程度、遠隔転移の有無等臨床病理学的因子である形態学的診断により病期(stage)が定められ、それに基づき予後が推測され、手術術式の選択や術後補助療法等の治療方針が決定されてきた。しかしながら、同一stage内の予後には相当のばらつきが認められることも事実であり、形態学的診断だけでは選別できなかった悪性度評価が分子生物学的研究より得られた知見をもとに、より明らかになるのではないかと期待されている。このような流れの1つとして見出された分子(遺伝子)の生物学的特性に注目した悪性度評価の試みが行われるようになった。発癌の分子生物学的研究だけでなく、増殖、転移、浸潤といった腫瘍生物学的研究の知見に基づき、これまでに多数の分子が、がんの悪性度評価因子として報告されてきた。さらに、治療に影響を与える可能性のある生体側の因子についても研究が進み、治療指針の参考あるいは決定に重要な役割を果たす因子の検索もなされつつある。

ここでは乳癌を例に取って、現在行われている病理検査とともに考えてみたい。乳癌の予後に最も重要な影響を及ぼすのは病期とリンパ節転移の有無(n因子)が昔から指摘されていた¹⁸⁾。また、病理組織学的異型度(histological grade)ならびにエストロゲンレセプター量(免疫組織学あるいは生化学的方法)も予後に重大な影響を与えることが報告されてきた(図7)¹⁹⁾。これらの因子とは独立した新たなファクターとして多数の分子が遺伝子レベル(あるいはタンパクレベル)で検討されてきた。その結果、いく

つかの遺伝子・染色体変化が予後と相関すること、予後因子としての意義は病期やn因子とは独立しているが、がんの組織学的異型度とは強い関連があることが示された。特にc-erbB-2の増幅や過剰発現、p53の点突然変異、bcl-2の発現消失、7q, 17qの染色体領域の欠失等の変化は予後因子として重要であることが明らかにされた²⁰⁾。以上から、将来これらの因子の遺伝子診断を行うことにより乳癌の悪性度が検索できると考えられる。また、c-erbB-2陽性の症例に対してはc-erbB-2のヒト型抗体であるHerceptinの有効性が証明され、既に日本でも使用が始まっている²¹⁾。Herceptinの投与にはc-erbB-2陽性の前提が必要なのでその発現レベルを遺伝子あるいはタンパク質レベルで検討することが必須となっている(図8)。現在、種々の分子標的薬剤が開発されているが、その有効群の選択にも遺伝子診断が必要と考えられる。

抗癌剤投与の効果を予測するのにも将来遺伝子診断が使用されると考えられる。抗癌剤の治療効果を発揮するためには代謝酵素の働きが重要なので、代謝酵素の発現を遺伝子レベルで調べることにより、その効果が予測できる。例えば、抗癌剤としてよく使用される5-FU(5-Fluorouracil)にはその作用に多くの酵素が関連している。TS(Thymidylate Synthase)はdUMP(2'-deoxyuridine-5'-Monophosphate)をdTMP(2'-deoxythymidine-5'-Monophosphate)に変換する酵素で、DNAの合成に最も重要な酵素である。5-FUを投与するとFdUMP(5-Fluoro-dUMP)に代謝され、FdUMPがCH₂THF(5,10-methylene-tetrahydrofolate)及びTS(Thymidylate Synthase)と三量体を形成することによりTSの活性を抑制し、DNAの合成阻害を起こすのが、5-FUの最も重要ながん細胞傷害メカニズムである。そこでTSの発現レベルを調べるのが5-FUの効果に重要となる。また、5-FUは酵素DPD(Dihydropyrimidine Dehydrogenase)により代謝され効果を失う一方、プロドラッグである5'-DFUR(5'-Deoxy-5-Fluorouridine)から酵素TP(Thymidine Phosphorylase)の代謝を受けて5-FUに変換される(図9)。そこでTPとともにDPD、TPの発現レベルを遺伝子レベル、タンパクレベルで投与前に検討することは5-FUあるいは5'-DFURの治療効果を予測する上で重要と考えられる。私たちの検討で

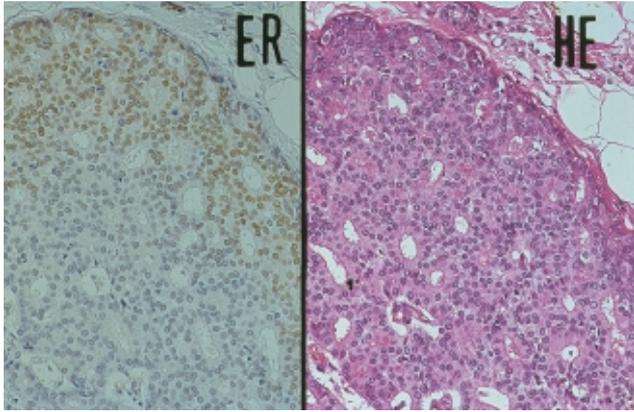


図7 . 免疫染色による乳癌組織中のエストロゲンレセプター有無の検索
乳癌細胞の多数にエストロゲンレセプター陽性の結果が認められる。

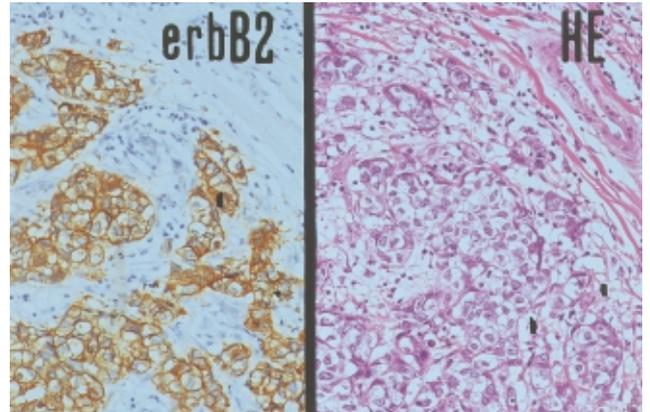


図8 . FISHによる乳癌細胞中のerbB-2有無の検索
乳癌細胞にerbB-2 mRNAの過剰発現があると診断される。ヒト型erbB-2抗体（Herceptin）を用いた治療が奏功した。

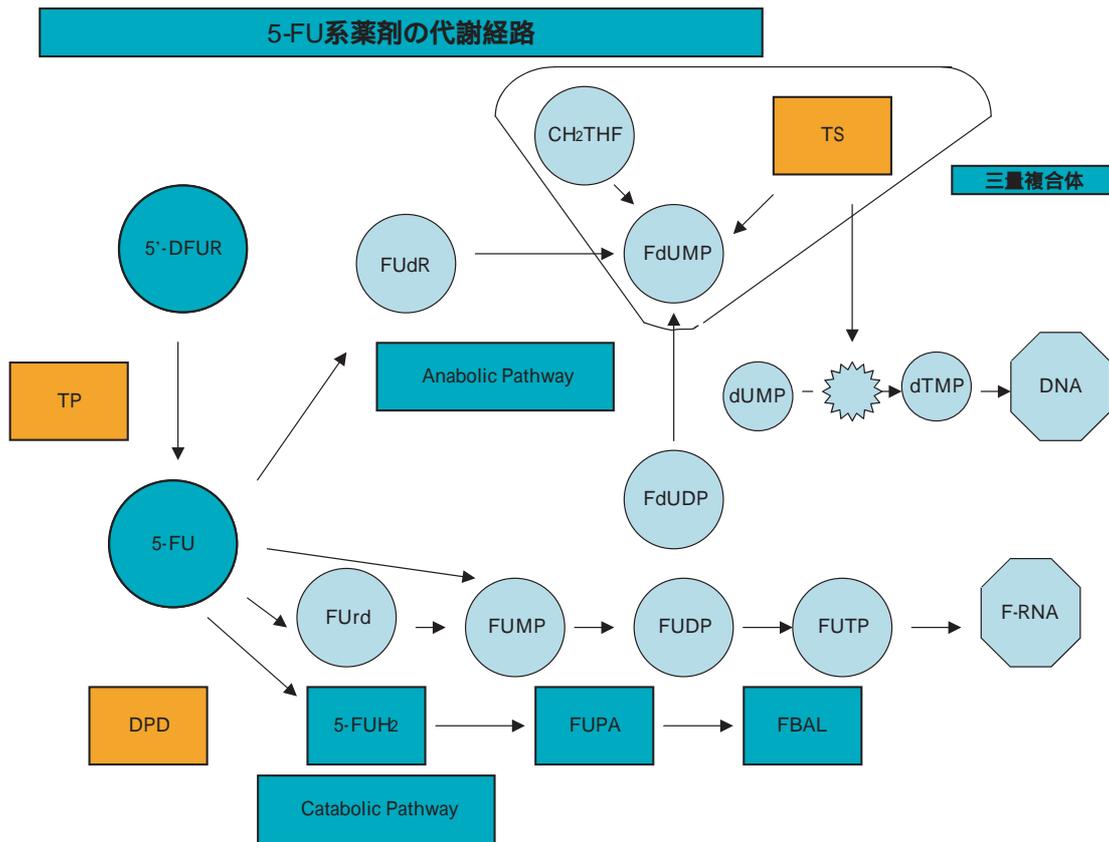
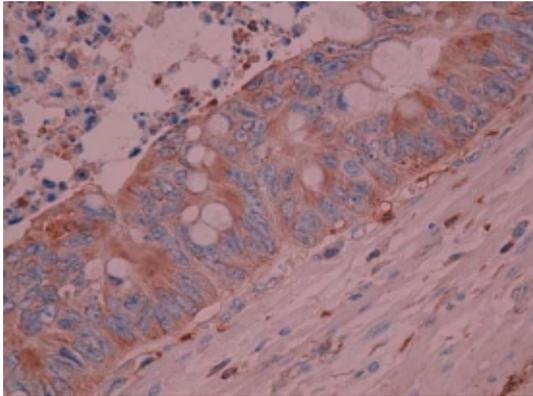


図9 . 5-FUの代謝経路
5-FU (5-Fluorouracil) はFUdR (5-Fluorodeoxyuridine) を経てFdUMP (5-Fluoro-dUMP) に代謝される。FdUMPはCH₂THF (5,10-methylene-tetrahydrofolate) 及びTS (Thymidylate Synthase) と三量体を形成することによりTSの活性を抑制し、DNAの合成阻害を起こす。5-FUからFUTP (5-Fluorouridine triphosphate) に変換され、RNA傷害に作用する経路もある。また、5-FUは酵素DPD (Dihydropyrimidine Dehydrogenase) により代謝され効果を失う一方、プロドラッグである5'-DFUR (5'-Deoxy-5-Fluorouridine) から酵素TP (Thymidine Phosphorylase) の代謝を受けて5-FUに変換される。

(A)



(B)

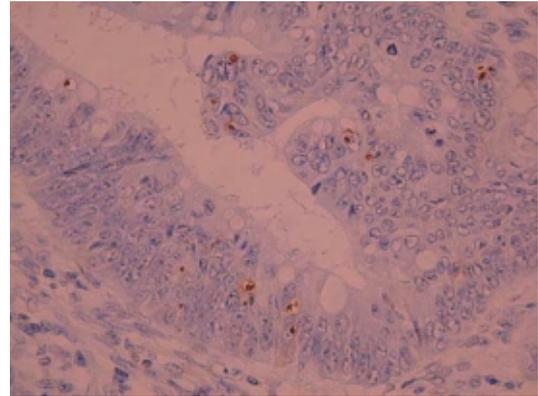


図10 .5'-DFUR (5'-Deoxy-5-Fluorouridine)
(A): 大腸癌組織中のTP(Thymidine Phosphorylase)発現,(B): 抗癌剤投与によるアポトーシスの検討。

はTPの発現レベルの高いものは5'-DFURの投与による治療効果が高い結果が得られている(図10)。将来は投与前に生検で組織を採取して、抗癌剤の代謝に関連する酵素の発現を検索した上で投与が決定されることが考えられる。

DNAアレイを利用した悪性度評価

がんの生物学的な悪性度診断に応用される手法にはLOHといったDNAレベルでの異常を調べる方法としてPCRを利用したSSCP(Single Strand Conformation Polymorphism)や、mRNAの発現をみるRT-PCR(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)、Northern blot法、in situ hybridization法、遺伝子産物(タンパクレベル)の発現性を調べる方法として免疫染色やWestern blot法などがこれまで用いられてきた。これらの手法はがんの発生や進展に関わる可能性のある特定の遺伝子や分子に着目して悪性度評価に応用しようとするものである。しかしながら、がんにおいては多数の遺伝子異常が多段階にわたり蓄積することにより発生・進展することが明らかになってきた。また、がんの個性化診断を臨床に取り入れ応用していくためには、単に個々の因子を追求するだけでなく、がんの発生・進展に関わ

る多数の遺伝子を体系的・網羅的に全体を捉えた解析の必要性が認識された。

従来の方法では多数の遺伝子発現解析を効率的に行うのはほとんど不可能であり、数百から数万のより多くの遺伝子情報を体系的・網羅的に解析するには迅速かつ同時に行われる必要があった。現在これに対してSAGE(Serial Analysis of Gene Expression)、ATAC-PCR(Adaptor-Tagged Competitive Polymerase Chain Reaction)等種々の方法が開発されているが、その中でがん研究における中心はDNA arrayを用いた方法であり、多数の報告が見られるようになってきた²²⁾。DNA arrayには基盤上にoligo DNAを合成したDNA chip(oligonucleotide microarray)(図11)とPCR productを直接スポットしたcDNA arrayがある。cDNA arrayにはナイロンメンブランを用いたcDNA filter array(cDNA macroarray)と、さらにより多くの情報解析が可能な特殊コーティングを施したスライドグラスを用いるcDNA microarrayがあり、それぞれ一長一短がある(表7)。最近cDNA microarrayを用いたびまん性大細胞性B細胞リンパ腫患者の腫瘍細胞における遺伝子発現プロファイルの解析により、分子レベルの分類が可能になり、従来の形態学的な診断では不可能であった予後予測が行えるようになったとの報告がされた²³⁾。今後、この分野が進歩することにより、多数の遺伝子の解析が短時間で効率よ

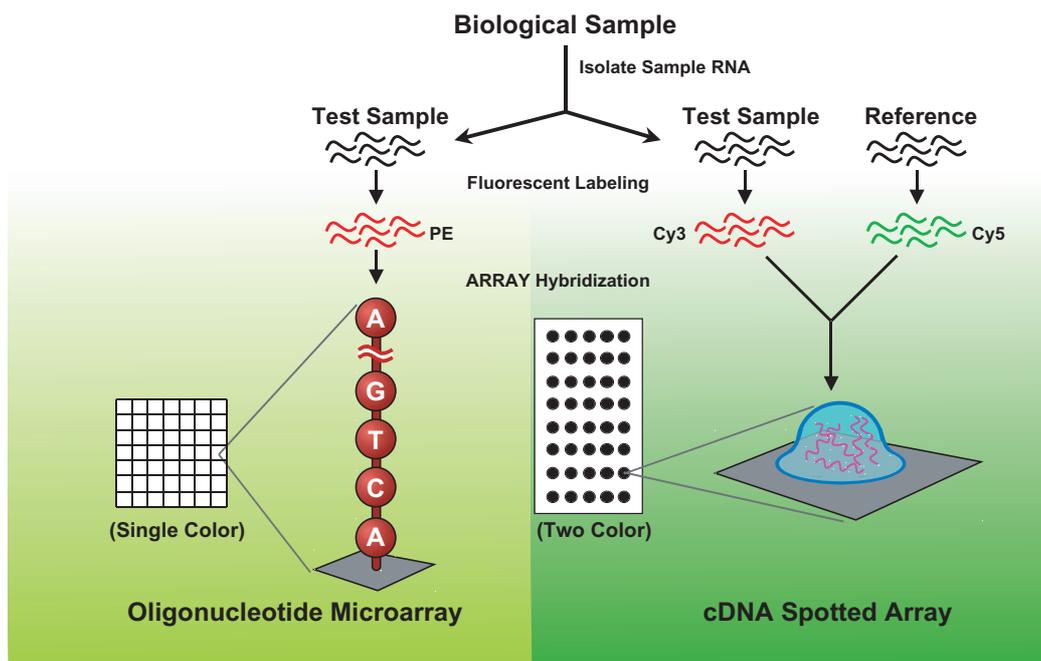


図11 . DNA チップの原理

表7 . DNA アレイ法の比較

	cDNA array		oligonucleotide array (DNA chip; Gene chip)
	cDNA macroarray	cDNA microarray	
プローブ長	制限無し	制限無し	< 25塩基
プローブ密度	< 500/cm ²	500 ~ 10,000/cm ²	244,000/cm ²
プローブ量	~ 20,000/フィルター	~ 15,000/スライド	~ 400,000/チップ
作製法	スポッティング	スポッティング	光リソグラフ
検出法	アイソトープ (32P, 33P) 蛍光色素 2枚のフィルターで2サンプル比較	2種類の蛍光色素 (cy3, cy5) 1枚のスライドで2サンプル比較	1種類の蛍光色素 2枚のチップで2サンプル比較
標識法	特異的オリゴDNAプライマー オリゴdTプライマー	特異的オリゴDNAプライマー オリゴdTプライマー	オリゴdTプライマー ランダムプライマー
再使用	可能	不可	不可
クロスハイブリダイゼーション	問題あり	問題あり	少ない
感度	高い	高い	低い
塩基配列情報	不要	不要	必要
カスタム化	容易	容易	現時点では不可
ダイナミックレンジ	広い	広い	狭い

く行うことができれば、予後の推定や治療方針の決定に重要な影響を与えることが予想される。

おわりに

がんの診療における現在考えられている遺伝子診断について概説した。いずれの方法もまだ研究レベルのものが大部分であり、今後実用化されるために

は器械、時間、コスト等種々の問題点をクリアしなければならない。しかし、何度も述べたようにがんは遺伝子の異常に起因する疾患であるから、必然的に遺伝子を検索する方向への診断方法に移行すべきであることは異論がなかろう。今後、この分野の研究が進み、1日も早い実用化がなされ、多くの患者がその福音を受けることを祈念して稿を閉じる。

参考文献

- 1) 厚生統計協会 : 厚生指標. 国民衛生の動向 : 47 ~ 55, 2002.
- 2) Kinzler KW, Vogelstein B : Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 87 : 159 ~ 170, 1996.
- 3) Wong NA, Pignatelli M : Beta-catenin--a linchpin in colorectal carcinogenesis? *Am J Pathol*, 160 : 389 ~ 401, 2002.
- 4) Muller A, Fishel R : Mismatch repair and the hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome (HNPCC). *Cancer Invest*, 20 : 102 ~ 109, 2002.
- 5) Cornelisse CJ, et al.: Genes responsible for familial breast cancer. *Pathol Res Pract*, 192 : 684 ~ 693, 1996.
- 6) Garber JE, et al.: The American Society of Clinical Oncology Position on Genetic Testing. *Cancer*, 80 : 632 ~ 634, 1997.
- 7) Dertinger SD, et al.: Aryl hydrocarbon receptor signaling plays a significant role in mediating benzo[a]pyrene- and cigarette smoke condensate-induced cytogenetic damage in vivo. *Carcinogenesis*, 22 : 171 ~ 177, 2001.
- 8) Yokoyama A, et al.: Genetic polymorphisms of alcohol and aldehyde dehydrogenases and glutathione S-transferase M1 and drinking, smoking, and diet in Japanese men with esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*, 23 : 1851 ~ 1859, 2002.
- 9) Noguchi M : Sentinel lymph node biopsy and breast cancer. *Brit J Surg*, 89 : 21 ~ 34, 2002.
- 10) Lacroix J, Doeberitz M : Technical aspects of minimal residual disease detection in carcinoma patients. *Seminars Surg Oncol*, 20 : 252 ~ 264, 2001.
- 11) Rosenberg R, et al.: Impact of cytokeratin-20 and carcinoembryonic antigen mRNA detection by RT-PCR in regional lymph nodes of patients with colorectal cancer. *Br J Cancer*, 83 : 1323 ~ 1329, 2000.
- 12) Hayashi N, et al.: Genetic diagnosis of lymphnode metastasis in colorectal cancer. *Lancet*, 345 : 1257 ~ 1259, 1995.
- 13) Liefers GJ, et al.: Micrometastasis and survival in stage II colorectal cancer. *N Eng J Med*, 339 : 223 ~ 228, 1998.
- 14) Noura S, et al.: Comparative detection of lymph node micrometastasis of stage II colorectal cancer by reverse transcriptase polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *J Clin Oncol*, 20 : 4232 ~ 4241, 2002.
- 15) Miyake Y, et al.: Extensive micrometastases to lymph nodes as a marker for rapid recurrence of colorectal cancer: a study of lymphatic mapping. *Clin Cancer Res*, 7 : 1350 ~ 1357, 2001.
- 16) Ghossein RA, Bhattacharya S : Molecular detection and characterization of circulating tumor cells and micrometastasis in solid tumors. *Europ J Cancer*, 36 : 1681 ~ 1694, 2000.
- 17) Curry BJ, Myers K, Hersey P : MART-1 is expressed less frequently on circulating melanoma cells in patients who develop distant compared with locoregional metastases. *J Clin Oncol*, 17 : 2562 ~ 2571, 1999.
- 18) Leong AS, Raymond WA : Prognostic parameters in breast cancer. *Pathology*, 21 : 169 ~ 175, 1989.
- 19) Davidson NE : Biology of breast cancer and its clinical implications. *Curr Opin Oncol*, 4 : 1003 ~ 1009, 1992.
- 20) Clark GM, McGuire WL : Follow-up study of HER-2/neu amplification in primary breast cancer. *Cancer Res*, 51 : 944 ~ 948, 1991.
- 21) Di Leo A, et al.: Current status of HER2 testing. *Oncology*, 63 : 25 ~ 32, 2002.
- 22) Lockhart DJ, et al.: Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotech*, 14 : 1675 ~ 1680, 1996.
- 23) Alizadeh AA, et al.: Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, 403 : 503 ~ 511, 2000.

Molecular Diagnosis of Cancer

Nariaki MATSUURA^{*1}, Masae YAMAGUCHI^{*1}, Noriko Ohnishi^{*1},
Yasushi SHINTANI^{*1}, Seiji MORI^{*1}, and Hirofumi YAMAMOTO^{*2}

*1 Department of Pathology, School of Allied Health Sciences, Faculty of Medicine, 1-7 Yamada-oka, Suita 565-0871.

*2 Osaka University, Department of Surgery II, Osaka University Medical School

Key Words Cancer, Molecular Diagnosis, Hereditary Tumor, Micrometastasis, Prognosis
